



UN OCÉANO, UN FUTURO



CENTENARIO
INSTITUTO ESPAÑOL
DE OCEANOGRAFÍA



ANDREA GARCÍA MARTÍNEZ

¿Y TÚ DE QUIÉN ERES?: USO DE MICROSATÉLITES PARA EL ANÁLISIS DE PARENTESCO EN *SOLEA SENEGALENSIS*

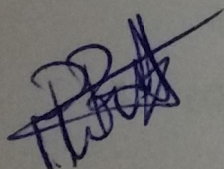
Tesis de Licenciatura , Julio 2014

Montserrat Pérez Rodríguez, Científico Titular de OPIs en el Instituto Español de Oceanografía de Vigo, Área de acuicultura,

INFORMA,

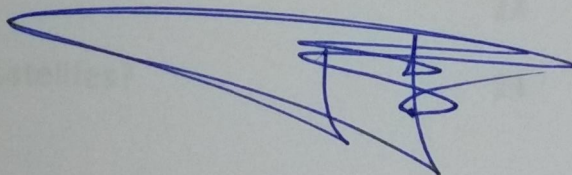
Que el trabajo titulado "*¿Y tú de quién eres? Uso de microsatélites para el análisis de parentesco en Solea senegalensis*", que presenta la Lda. en Biología por la Universidad de Vigo **D^a. Andrea García Martínez**, ha realizado bajo su dirección en el Área de Acuicultura del Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía, actuando como tutor y ponente académico el Dr. Pablo Presa Martínez del Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Facultad de Biología de la Universidad de Vigo. El trabajo cumple con las condiciones mínimas de autenticidad de la investigación, por lo que autoriza se presentación ante el tribunal examinador.

En Vigo, el 17 de junio de 2014



Fdo.: Montserrat Pérez

Directora

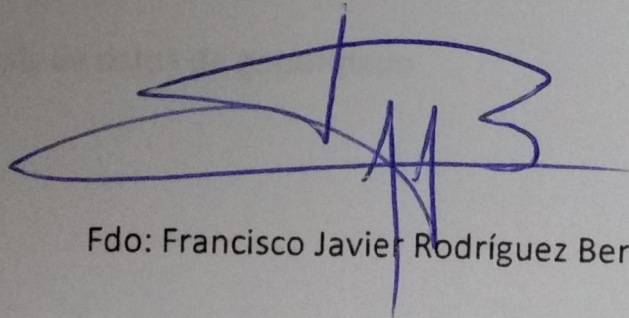


Fdo.: Pablo Presa

Tutor y Ponente académico

VºBº

El director del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología de la Universidad de Vigo



Fdo: Francisco Javier Rodríguez Berrocal

ÍNDICE

I. Introducción	3
1.1. Cultivo Integral de <i>Solea senegalensis</i>	3
1.2. Situación actual de <i>Solea senegalensis</i> en el mercado	5
1.3. Reproducción de <i>Solea senegalensis</i>	6
1.4. Problemática del cultivo	7
1.5. Herramientas moleculares	9
1.5.1. Aplicaciones de los microsatélites	10
1.5.1.1. Aplicaciones en mejora genética	10
1.5.1.2. Estudios de biodiversidad	10
1.5.1.3. Filogenia	11
1.5.2. Ventajas y desventajas	12
1.5.2.1. Ventajas	12
1.5.2.2. Desventajas	12
1.5.3. ¿Qué aportan los microsatélites?	13
 II. Material y métodos	 15
2.1. Material biológico	15
2.2. Extracción de ADN	16
2.3. Amplificación por PCR de los loci seleccionados	18
2.4. Genotipado de las muestras	20
2.5. Análisis de datos de genotipado	22

III. Resultados y discusión	24
3.1. Amplificación y genotipado	24
3.2. Estimas de la diversidad genética	24
3.3. Análisis de parentesco	27
3.3.1. Análisis de parentesco con el programa Vitassign	27
3.3.2. Análisis de parentesco con el programa Cervus	30
3.4. Diseño de la herramienta de asignación	34
3.5. Entonces, ¿Quiénes son los padres?	35
IV. Conclusiones	36
V. Bibliografía	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Solea senegalensis</i>	3
Figura 2. ADN total de <i>Solea senegalensis</i>	18
Figura 3. PCR del microsatélite Gata 38	20
Figura 4. GeneScan 500 Liz Standard	21
Figura 5. Genotipado de Sol 9A, Sol 13D, Gata 38 y CA13	22
Figura 6. Asignaciones de parentesco con el programa Cervus (I)	32
Figura 7. Asignaciones de parentesco con el programa Cervus (II)	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen y sexo de los reproductores	16
Tabla 2. Secuencia y condiciones de amplificación de los microsatélites	19
Tabla 3. Estimaciones de diversidad genética con Cervus	25
Tabla 4. Resultados de análisis de parentesco con Vitassign (I)	28
Tabla 5. Resultados de análisis de parentesco con Vitassign (II)	29
Tabla 6. Porcentajes de exclusión con Cervus	31

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podía haberse realizado sin la ayuda de mi directora de Tesis de Licenciatura, Montse Pérez a quien quiero agradecerle el haberme dado la oportunidad de hacer este proyecto y haberme apoyado y guiado tan bien durante su elaboración. También quiero agradecer a mis compañeros Manuel Nande y Angie Santafé por echarme una mano cuando lo necesitaba.

Personalmente, dar las gracias por el apoyo, cariño y comprensión incondicional de mis padres, Juan y Lourdes, mi hermana Sara y mis tías Maricarmen y Ana, que siempre confiaron en mí y sin ellos nunca habría llegado a donde estoy. Por último, quiero darles las gracias a Jairo, Aida, Loli y Pablo por escuchar interminables historias sobre genética y estar siempre ahí.

INTRODUCCIÓN

La especie objeto de nuestro estudio es *Solea senegalensis* Kaup, o lenguado senegalés. Se encuentra en el mar Mediterráneo y en las costas atlánticas desde el golfo de Vizcaya hasta Senegal (Figura 1). Esta especie se ha sometido a cría intensiva en acuicultura debido a su alto valor comercial y al rápido desarrollo de los huevos. A pesar de estas características favorables, todavía hay problemas para su cultivo, fundamentalmente por causas inherentes a la especie como las dificultades que presenta su reproducción en cautividad.

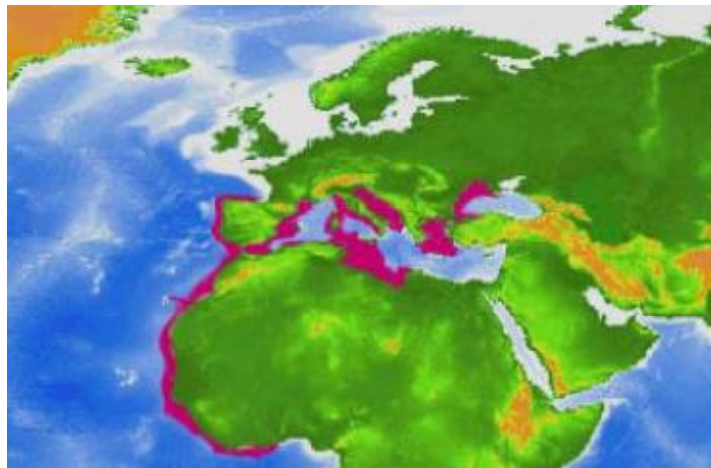


Figura 1. Distribución geográfica de *S. senegalensis* (color púrpura) según Porta *et al.* (2006).

1.1. Cultivo integral de *Solea senegalensis*

La especie más cultivada en la región atlántica y norte de Europa es el lenguado común, *Solea solea*, mientras que en el sur de Europa, principalmente España y

Portugal, la especie con un mayor potencial en el campo de la acuicultura es el lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Dinis *et al.*, 1999). Esto se debe principalmente a características como: que las hembras de *S. senegalensis* llegan a la madurez cerca de su tercer año de edad, un año antes que *S. solea*, además, de las dos especies, *S. senegalensis* presenta tasas de crecimiento mayores. Los primeros estudios en el campo de la reproducción de esta especie se realizaron en España (Rodríguez, 1984) y Portugal (Dinis, 1986; 1992), donde se ha cultivado siguiendo el método extensivo (Drake *et al.*, 1984). Actualmente, esta especie se considera idónea para diversificar la acuicultura en países mediterráneos.

La complejidad técnica para el cultivo del lenguado, el control de la reproducción en cautividad o la incidencia de enfermedades es superior a otras especies cuyo cultivo está ampliamente implantado. Además, se ha comprobado una acusada reducción de la variabilidad genética debida a endogamia por la constitución de stocks de reproductores con individuos de la misma familia o descendientes de éstas (Cañavate, 2005).

Esta especie posee un gran potencial genético y los stocks salvajes de lenguado mantenidos constituyen modelos ideales sobre los que realizar programas de selección genética que permitan conseguir ejemplares más adaptados a las necesidades de la cría intensiva. La aplicación de técnicas de genómica y proteómica es de vital importancia como medio para maximizar la eficiencia en la cría del lenguado (Cañavate, 2005). Sin embargo, aún no han sido desarrollados métodos para controlar la puesta en cautividad, lo cual resulta esencial para el desarrollo del su cultivo. Se han conseguido puestas mediante la manipulación del termo período (Anguis y Cañavate, 2005), pero este método no está optimizado.

1.2. Situación actual de *Solea senegalensis* en el mercado

Gran parte de los proyectos en acuicultura en Europa están enfocados a la optimización del cultivo de lenguado senegalés con objeto de que ésta sea la próxima especie sometida a cultivo intensivo. Si las previsiones de producción se cumplen, el próximo año será clave para comprobar el comportamiento de los mercados ante el aumento de oferta de esta especie.

Empresas como *Cupimar* poseen plantas de engorde de lenguado en varios puntos de España, a su vez, la empresa *Stolt Sea Farm* ha abierto una planta de lenguados en Islandia recientemente, que se espera llegue a producir 2000 toneladas anuales de esta especie. Se calcula que esta planta alcanzará su mayor nivel de producción en 2016, lo que se verá apoyado por la reciente adquisición del criadero *Alrogal* en Galicia. Este criadero pertenece a la empresa del grupo *Acuidoro* que gestiona el centro de reproducción de peces planos, una hatchery de la que salen tanto rodaballos como lenguados. Las instalaciones de *Alrogal* proporcionarán todos los juveniles de lenguado necesarios para la expansión. Aunque estas son las producciones más importantes, también se suman otras a menor escala como *Sea8* en Portugal, con capacidad de producción de 450 toneladas, o *Futuna Blue España*, que puede llegar a producir cerca de 60 toneladas.

1.3. Reproducción de *Solea senegalensis*

El cultivo del lenguado se basa, al igual que en el resto de especies, en la estabulación de peces salvajes obtenidos del medio marino para la formación de lotes de reproductores, que se reproducen generando larvas de la generación F1. La reproducción del lenguado senegalés en cautividad se comenzó a estudiar en la década de los 80 y continúa hoy en día (Rodríguez *et al.*, 1982). En el caso del lenguado senegalés, los peces F1 suelen presentar problemas reproductivos en edad adulta, mientras que las hembras F1 son capaces de producir huevos fertilizados con puestas espontáneas siempre y cuando estén acompañadas por machos salvajes (Mañanós, 2011). Además, se ha demostrado que los machos F1 no tienen un comportamiento de cortejo normal (Carazo *et al.*, 2009). Lo que se sabe hasta el momento es que en lenguados existe una gran influencia de las pautas de cortejo sexual y la acción de feromonas sobre el proceso de fecundación en el tanque (Agulleiro, 2008). También se ha detectado una influencia de la alimentación, obteniéndose mejores resultados de puesta en reproductores alimentados con comida natural que los que se alimentan con pienso comercial (Norambuena, 2009). Se ha descrito la fisiología reproductiva en cautividad y se han ajustado protocolos específicos de manipulación ambiental (fotoperiodo y temperatura), así como tratamientos hormonales, con resultados positivos en cuanto a la estimulación de la ovulación y espermiación, e incluso al incremento de la producción de huevos, pero que resultan ser inviábiles. Hasta la fecha no se han obtenido larvas F2, excepto utilizando técnicas de fertilización artificial con esperma criopreservado (Rasines *et al.*, 2012).

La causa de este comportamiento anómalo continua siendo un enigma y por esta razón, la investigación sobre este tema es de suma importancia para solucionar este cuello de botella en el cultivo de *S. senegalensis*.

Estas dificultades afectan negativamente a su viabilidad y a la rentabilidad económica como cultivo a escala industrial, pues impiden la producción de huevos y larvas de manera controlada y que se pueda considerar realmente cerrado el ciclo vital de la especie en cautividad.

En la actualidad, los alevines de lenguado senegalés presentan un crecimiento optimizado, pero el factor limitante sigue siendo la ausencia de métodos para el control de la reproducción bajo condiciones de estabulación.

En algunas zonas del sur de España y Portugal se han conseguido puestas viables procedentes de los reproductores salvajes estabulados a lo largo de varios años, aunque se producen de manera poco predecible (Dinis *et al.*, 1999; Anguis y Cañavate, 2005).

1.4. Problemática del cultivo

Los problemas en el desarrollo de alevines surgen mayoritariamente como consecuencia de la consanguinidad. La consanguinidad aumenta cuando se aparean individuos emparentados entre sí. El grado de consanguinidad puede controlarse estableciendo las relaciones de parentesco entre los individuos y con cruzamientos dirigidos. En general, todos los animales de una misma raza se encuentran emparentados, pero el término consanguinidad se utiliza cuando se produce el apareamiento de animales con mayor grado de parentesco que el

promedio de la población (Molina *et al.*, 1995; Bijma *et al.*, 2001; Parland *et al.*, 2007).

Hay elementos en la gestión de animales en criaderos que provocan el aumento del grado de consanguinidad, como que éstos se encuentren confinados en un mismo espacio reducido. Sus consecuencias son muy negativas en cultivo, una de ellas es la disminución del rendimiento medio de ciertos caracteres productivos (Burrow, 1993; Falcao *et al.*, 2001; Ruíz-Flores *et al.*, 2006).

A consecuencia de la endogamia aumenta la frecuencia de genes deletéreos, cuyo aumento en la población provoca una disminución de la eficacia biológica, e incluso pueden llegar a ser letales tras varias generaciones de endogamia. Su capacidad de supervivencia y de reproducción es menor. Por ello, los individuos son menos fértiles y constituyen líneas de difícil mantenimiento.

Estas premisas son de elevado interés para los criadores, ya que deben conocer la estructura y constitución genética de sus stocks de reproductores, así como los posibles efectos adversos de la consanguinidad en el comportamiento y, cuando sea necesario, redefinir los criterios de selección y apareamiento en los individuos.

Para caracterizar los stocks de reproductores, se realiza una evaluación de la variabilidad genética y su distribución entre stocks, además de la detección de alelos raros que indiquen la presencia de variantes genéticas únicas (González-Candelas y Montolio, 2000).

Para resolver otro de los problemas que afecta a la cría de *Solea senegalensis*, que es la acusada reducción de la viabilidad de ejemplares juveniles, debido a procesos endogámicos, es necesario conocer más su estructura poblacional y su

pedigree. Para ello, es imprescindible el uso de herramientas moleculares que permitan hacer correctamente la asignación de parentales y conocer su genealogía.

1.5. Herramientas moleculares

Los microsatélites son un tipo de marcadores genéticos formados por repeticiones de dos a seis pares de bases (González, 2003; Cruz *et al.*, 2005). Cada microsatélite se define por el tipo de unidad repetida (di- , tri- y tetranucleotídicos). Aunque poseen altas tasas de mutación, sus regiones flanqueantes están muy conservadas, por lo que se utilizan para la amplificación del locus en cuestión (Morgante y Olivieri, 1993). Estas regiones pueden utilizarse para la amplificación de microsatélites homólogos en especies muy relacionadas utilizando los mismos cebadores (amplificación cruzada), lo que resulta muy útil para la obtención de marcadores altamente polimórficos para realizar análisis de parentesco. Son de herencia codominante (se distinguen todos los homocigotos entre sí y estos de los heterocigotos). Poseen una alta variabilidad en la longitud de la secuencia, lo cual se hereda de manera estable de forma mendeliana y suelen ser selectivamente neutros. Son muy útiles como marcadores genéticos debido a que están repartidos de forma azarosa en el genoma, presentan una alta abundancia, son muy polimórficos y permiten trabajar con reducidas cantidades de ADN (Cruz *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2005).

1.5.1. APLICACIONES DE LOS MICROSATÉLITES

1.5.1.1. Aplicaciones en mejora genética

Para llevar a cabo planes de mejora genética se necesita una herramienta molecular que tenga como características principales: permitir la total diferenciación de los progenitores y que sea transmitido de forma estable a la descendencia (Paterson *et al.*, 1991) además de proporcionar abundante información.

La base molecular de estas herramientas es la diversidad en el número de veces que se repite una unidad básica por la que está formada y en la variabilidad intrasecuencial de ésta. Los microsatélites se amplifican por PCR, utilizando como cebadores las secuencias flanqueantes, al encontrarse más conservadas (Morgante y Olivieri, 1993).

1.5.1.2. Estudios de biodiversidad

El uso de los microsatélites en estudios de biodiversidad ha ido aumentando considerablemente en los últimos años, debido principalmente a su elevado polimorfismo y a la posibilidad de trabajar con pequeñas cantidades de ADN, que pueden ser obtenidas sin necesidad del sacrificio del individuo. Son de elevada utilidad para dilucidar aspectos como la detección de cuellos de botella en determinadas poblaciones (Hauser *et al.*, 2002,) en conservación (González, 2003), para la medición del flujo génico entre poblaciones (Pita *et al.*, 2011), asignación de parentales (Pardo *et al.*, 2006), determinación de la población de origen de individuos (Pita *et al.*, 2010), etc.

El uso de estos marcadores de forma generalizada comenzó tras las primeras publicaciones de su aislamiento y caracterización (Litt y Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber y May, 1989). En particular, en peces desde 1993 con el aislamiento de microsatélites y su aplicación en *Salmo trutta* (Estoup *et al.*, 1993).

1.5.1.3. Filogenia

Aunque su tasa de mutación es elevada, sus regiones flanqueantes se mantienen conservadas y son la base para realizar hipótesis filogenéticas entre especies cercanas. De este modo se han utilizado para resolver filogenias en familias de cíclidos (Zardoya *et al.*, 1996) y salmónidos (Koskinen *et al.*, 2002) entre otros. A pesar de estar ampliamente estudiados y caracterizados, aún se desconocen aspectos como su función, debido a que se encuentran tanto en regiones codificantes y en mayor grado en no codificantes (Pérez *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2005). No hay consenso sobre los patrones de variación de tamaño de alelos entre generaciones o qué factores concretos determinan la tasa de mutación (Hancock, 1999; Li *et al.*, 2002; Sibly *et al.*, 2003).

El proceso de evolución de los microsatélites se ha intentado explicar mediante tres modelos: El modelo del K-alelo (Crow y Kimura, 1970), el modelo de alelos infinitos (Kimura y Crow, 1964) y el del salto mutacional (Kimura y Ohta, 1978). Este último es el más aceptado y postula que las mutaciones son el resultado de la ganancia o pérdida de una única unidad de repetición en los alelos ya existentes en la población, conservando memoria acerca del anterior estado alélico (Goldstein *et al.*, 1995; Balloux y Goudet, 2002).

1.5.2. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MICROSATÉLITES

1.5.2.1. Ventajas

Su tamaño permite trabajar con tejido de poca calidad o ADN en proceso de degradación, lo que resulta muy útil en el estudio poblacional de especies en peligro de extinción, ya que se puede amplificar a partir de muestras de heces, hueso o pelo (Hoss y Paabo, 1993), plumas (Ellegren, 1993), que no implican el sacrificio del ejemplar.

Aplicados a poblaciones son útiles para estudiar los movimientos, el área de distribución y la estructura de poblaciones sin necesidad de contacto directo con los individuos (Sloane *et al.*, 2000).

Hay ocasiones en las que se pueden utilizar los cebadores de una especie en taxones cercanos (amplificación cruzada). Existen ejemplos en mamíferos (Moore *et al.*, 1991), tortugas (FitzSimmons *et al.*, 1995), aves (Primmer y Ellegren, 1998) y peces (Zardoya *et al.*, 1996) en los que se ha amplificado en especies separadas entre 100 y 400 millones de años.

1.5.2.2. Desventajas

Para utilizar los microsatélites es necesario aislar marcadores específicos de la especie que se quiere estudiar, lo que conlleva un gasto económico y de tiempo. Esto puede resultar más complicado trabajando con organismos en los que el aislamiento sea más difícil o porque los microsatélites aislados para un grupo taxonómico no se puedan utilizar con grupos próximos (Primmer y Merila, 2002).

El uso de cebadores para amplificar microsatélites mediante PCR en especies próximas puede ser un inconveniente por la presencia de alelos nulos, pues pueden presentar mutaciones, inserciones y/o deleciones en los sitios de unión de los cebadores. Esto puede dar lugar a la identificación errónea de individuos heterocigotos como homocigotos y provocar la acumulación de errores analíticos.

1.5.3. ¿QUÉ APORTAN LOS MICROSATÉLITES A NUESTRO ESTUDIO?

Por todas las características descritas, los microsatélites son idóneos para este estudio, ya que reúnen las características necesarias para ser una herramienta fiable de análisis de parentesco y pedigree.

Anteriormente han sido descritos y evaluados una serie de microsatélites en peces planos y, en concreto, en *Solea senegalensis* (Castro *et al.*, 2006; Porta *et al.*, 2006). Dichos microsatélites fueron probados con una serie de individuos y presentan buenas tasas de amplificación. Con estos marcadores se desarrollaron dos herramientas moleculares para asignación de individuos nacidos en cautiverio a sus parentales. Estos datos poseen un alto valor para el mejor mantenimiento y gestión de los stocks.

Sin embargo, el análisis con los sets de marcadores publicados anteriormente (Castro *et al.*, 2006; Porta *et al.*, 2006) no permitió hacer una adquisición correcta de los individuos. Por ello, se decidió seleccionar los marcadores que se describen en este trabajo para diseñar una herramienta más fiable.

Este trabajo se ha desarrollado en el marco de un proyecto JACUMAR de la Comunidad Autónoma de Galicia titulado “Estudio del comportamiento

reproductor del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en individuos salvajes y nacidos en cautividad (F1)". En este proyecto participaron el Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía, el Instituto Galego de Formación en Acuicultura (IGAFA) y el Centro de Investigaciones Mariñas (CIMA) ambos de la Xunta de Galicia.

En 2010 se constituyeron dos tanques de reproductores, uno de ellos con hembras salvajes y machos F1 y salvajes y el otro con hembras F1 y machos F1 y salvajes. Solamente se obtuvieron puestas viables en el tanque con hembras F1.

Por tanto el **objetivo general** del presente trabajo fue asignar la descendencia a los parentales de lenguado. Los **objetivos específicos** fueron:

- ✓ Poner a punto una batería de marcadores útil, con el mínimo número de microsatélites que permitan la asignación inequívoca a los parentales.
- ✓ Determinar si el macho responsable de la puesta con la que trabajamos era salvaje o pertenecía a la F1.

Los resultados podrán extrapolarse a todas las instalaciones en las que se lleve a cabo la cría del *Solea senegalensis*, estandarizar el uso de la batería de microsatélites propuesta y sus condiciones y diseñar las familias siguiendo el esquema propuesto. De este modo, se reducirá la endogamia y se minimizarán los efectos de la reducción de la variabilidad genética a causa de la depresión consanguínea.

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

Se utilizaron muestras de 67 ejemplares de *S. senegalensis*, de los cuales 17 pertenecían al stock de reproductores y 50 a la descendencia. Los individuos del stock de reproductores utilizados en el presente trabajo estaban estabulados desde 2006 en el Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía. Además se utilizaron 50 individuos criados en cautividad y nacidos en 2011.

El diseño experimental previo consistió en la constitución de dos tanques de reproductores en 2010:

- Tanque 6, en adelante T6, en el que se mantuvieron 14 hembras F1, 5 machos salvajes y 3 machos F1.
- Tanque 7, en adelante T7, en donde se mantuvieron 12 hembras salvajes, 8 machos F1 y 4 machos salvajes.

En 2011, se obtuvieron puestas espontáneas en ambos tanques, pero únicamente una de las puestas del T6 resultó ser apta para el cultivo. Cuando los ejemplares presentaban un tamaño adecuado, se realizó un muestreo de aleta caudal de 50 individuos F1 que se conservó en alcohol hasta la extracción de ADN posterior.

Código	Sexo	Origen
Ind 1		F1
Ind 2		F1
Ind 3		Salvaje
Ind 4		Salvaje
Ind 5		F1
Ind 6		F1
Ind 7		F1
Ind 8		F1
Ind 9		F1
Ind 10		F1
Ind 11		F1
Ind 12		F1
Ind 13		F1
Ind 14		Salvaje
Ind 16		Salvaje
Ind 19		Salvaje
Ind 21		F1

Tabla 1. Origen y sexo de los reproductores analizados.

2.2. Extracción del ADN

El ADN se extrajo de muestras de aleta caudal de los ejemplares de lenguado. A partir de éstas se hizo una extracción con Chelex 10 % (Walsh *et al.*, 1991). Este método es rápido y sencillo y se basa en el uso de una resina quelante inhibidora de las nucleasas y ligasas que no interfiere en la reacción de PCR.

Se utilizó en solución, que se añadió sobre la muestra y se incubó a 56°C durante 30 minutos. Esto permitió el lisado de las células, la eliminación de proteínas, contaminantes e inhibidores. Después, las muestras se calentaron a 100°C durante 8 minutos, provocando que el ADN se desnaturalice y la destrucción de

las proteínas celulares. Para finalizar, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 r.p.m. Se recogió el sobrenadante, que contenía el ADN y se guardó en nevera a 4°C hasta su posterior amplificación.

En aquellas muestras en las que no se obtuvo amplificación de alguno de los marcadores se realizó una segunda extracción con el método FENOSALT (Pérez y Presa, 2011), que permite extraer ADN más puro. El protocolo consistió en añadir a la muestra 500 µL de buffer de lisis (0.1M Tris; 0.01 M EDTA; 0.1 NaCl; 1% SDS; pH=8). Posteriormente, se añadieron 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Tras este paso, se mezcló en vórtex y se incubó 55°C, 1 hora a 300 rpm. Cuando el tejido estuvo disuelto, se centrifugó a 8000 rpm durante 3 minutos. Al finalizar, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló por inversión 20 veces con 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamil alcohol (25:24:1). Después se centrifugó a 8000 rpm 5 minutos. Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se mezcló 20 veces con 1 volumen de cloroformo: isoamil alcohol (24:1). Se centrifugó de nuevo a 8000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se mezcló por inversión con 2 volúmenes de etanol puro. Se realizó una centrifugación a 4°C, 12000 rpm durante 20 minutos. Tras la centrifugación, se lavó el pellet en alcohol al 70%. Se centrifugó una última vez a 13000 rpm, a 4°C. Por último, se eliminó el alcohol y se secó el pellet en speed vacuum durante 5 minutos a 45°C. El producto resultante se resuspendió en 100 µl de agua o TE.

La calidad y la cantidad de ADN extraído se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (Tris Acetato EDTA) de 5 µl de cada muestra junto a un marcador molecular de 100 pb (Hyper Ladder IV de Bioline). La tinción se efectuó con bromuro de etidio (Figura 1).

El gel migró 30 minutos y se visualizó con luz ultravioleta en un transiluminador.

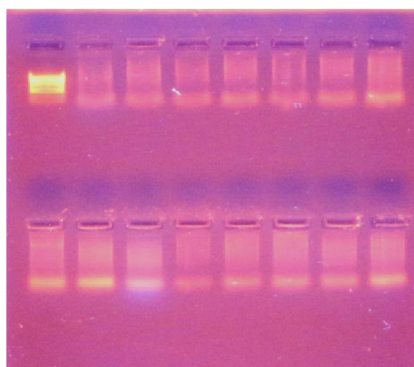


Figura 2. Gel de agarosa para comprobar la calidad del ADN. Calle 1: marcador de pesos Hyper Ladder IV. Calles de la 2 a la 8 y de la 9 a la 16: muestras de la extracción de ADN de reproductores de lenguado.

2.3. Amplificación por PCR de los loci seleccionados

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es posible sintetizar numerosas copias de un fragmento de ADN usando una polimerasa que actúa a elevadas temperaturas, el número de copias aumenta de forma exponencial.

En nuestro caso, para alcanzar los objetivos propuestos, se testaron (Tabla 2) los loci microsatélite Sol 13 D y Sol 9A (Porta *et al.*, 2006) y GATA 38, Sol CA13, Smax 02 y F13 (Castro *et al.*, 2006) en los individuos del stock de reproductores. Se pusieron a punto las condiciones de amplificación para las distintas parejas de cebadores mediante la variación de ciertas condiciones como la concentración de $MgCl_2$ o la temperatura de anillamiento. La amplificación por PCR de los microsatélites se llevó a cabo en un termociclador Agilent Sure Cyclor 8800. El volumen final de la reacción fue de 15 μ L, con 100 ng de ADN genómico

(aproximadamente 2 µL del extracto), 150 µM de dNTPs, entre 1.5 y 2.0 mM de Magnesio según el locus amplificado, 10 pmoles de cada cebador (el forward de cada pareja marcado con el fluoróforo correspondiente (Tabla 2), 0.5U de polimerasa (NZYTaQ DNA polimerase), 1.5 µL de tampón de reacción y agua pura hasta completar el volumen de 15 µL. Además de los individuos problema, se amplificó un control negativo. Cada PCR constó de los siguientes ciclos: 1 ciclo de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, 58°C durante 30 segundos y 72°C durante 40 segundos y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Nombre	Primers (5'→3')	Unidad repetida	Tª de annealing (°C)	MgCl ₂ (mM)	Marcaje
Sol 13D	GATCATTAGAGAGGTCACACGAGC CATGACATCATCGCAGACC	(GT) ₁₂	59	1.5	PET
Sol 9A	GATCCTCTGTGCCACGACGTTGG GATCTGGCCGAGAGCAGATGC	(GT) ₁₂	59	1.5	6-FAM
GATA 38	ATATCATCAGGCAGTAAACGGTCGCA AATG GCAATCTGCAAACTGACCACTAGATGC CAGT	(GATA) ₂₀	62	2.0	HEX
Sol CA13	ATCCCGAGAAGGCAGATGT AGTGGAATCAATTCCTGTGG	(GAA) ₁₀	60	1.5	6-FAM
Smax 02	GGAGGATGTATTGAAAGTGT AGAGCAGGTCATTATACAGC	(TG) ₁₆	58	1.5	NED
F 13	GGCTGCAGAACGATCTTTAC GCAACCTTGAGCTGTGACC	(TG) ₈ CGC(G T) ₄ (GA) ₇	60	1.5	6-FAM

Tabla 2. Secuencia y condiciones de amplificación de los microsatélites empleados.

Los productos obtenidos en la PCR se migraron en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio que se visualizó en un transiluminador (Figura 3).

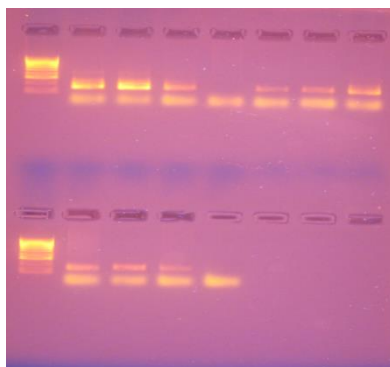


Figura 3. Gel de agarosa con los productos resultantes de la PCR del microsatélite GATA 38. Calles 1 y 9: marcador molecular de 100 pb (Hyper Ladder). Calles de 2 a 8 y de 10 a 12: amplicones. Calle 13: control negativo.

2.4. Genotipado de las muestras

Una vez comprobada la correcta amplificación en el gel de agarosa se procedió a la mezcla de las PCRs de los distintos microsatélites analizados junto a un estándar marcado y formamida desionizada. En nuestro caso el estándar se llama *GeneScan™-500 LIZ Size Standard* y está marcado con el fluoróforo LIZ, de color naranja. Este estándar está diseñado para tallar fragmentos entre 35 y 500 pares de bases y proporciona 16 fragmentos marcados de 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250*, 300, 340, 350, 400, 450, 490 y 500 bases (Figura 4).

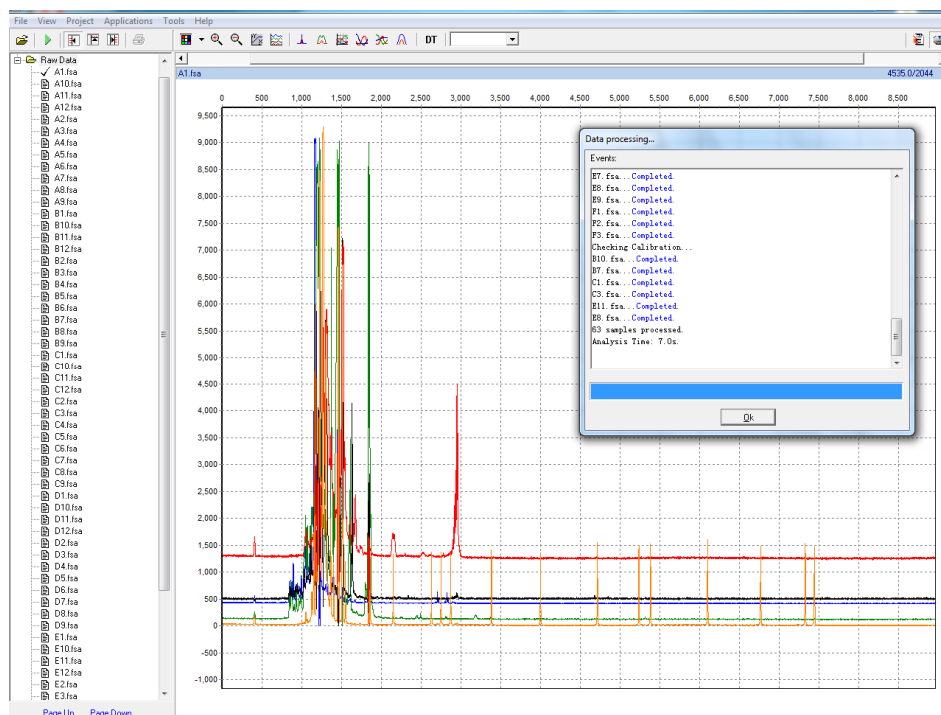


Figura 4. GeneScan™-500 LIZ Size Standard en naranja.

Los fragmentos se migraron en un ABI Prism 310 DNA Sequencer (*Applied Biosystems*) disponible en el *Centro de Apoio Científico e Tecnológico a Investigação* (CACTI) de la Universidad de Vigo. Este aparato es un secuenciador automático con capilares que recogen de la placa cada muestra de modo independiente y la hacen pasar por un haz de luz que excita el fluoróforo y se talla por comparación con los fragmentos del estándar utilizando, en nuestro caso, el programa GeneMarker v2.4.0. (Figura 5).



Figura 5. Microsatélites Sol 9A, Sol 13D, GATA 38 y Sol CA13 de lenguado migrados en un *ABI Prism 310 DNA Sequencer*.

2.5. Análisis de datos

Una vez analizados en el secuenciador se seleccionaron los alelos con el programa GeneMarker v2.4.0. Este programa permite la visualización de los picos resultantes del genotipado. Por comparación con el estándar, estima el tamaño de los alelos de cada individuo. Los datos genotípicos de cada individuo se registraron en una hoja de cálculo Excel, junto al sexo de los individuos y el año de nacimiento.

Los análisis de parentesco se realizaron con dos programas que representan los dos principales métodos para llevar a cabo una asignación:

- Vitassign: (Vandeputte *et al.*, 2006) se basa en el principio de exclusión comprobando la compatibilidad de los genotipos de parentales y descendencia siguiendo un modo de herencia mendeliana. Por ello, un parental y un individuo de la descendencia deberán compartir al menos, un alelo de cada locus. Para los microsatélites, el análisis de parentesco se ha realizado permitiendo de 0 a 3 incongruencias, lo que es típico cuando se trabaja con éstos.

- Cervus: (Marshall *et al.*, 1998; www.fieldgenetics.com) este programa utiliza el método de máxima probabilidad (*likelihood*) para estimar las relaciones más probables entre los parentales candidatos y el grupo de descendientes (Wang, 2012). El método se basa en el cálculo de una puntuación LOD, que nos informa de la probabilidad que tiene un individuo (o un par de individuos) de ser el padre (o los parentales) de un determinado descendiente, dividido entre la probabilidad de que los individuos no estén relacionados. La descendencia es asignada a los parentales con la mayor puntuación LOD. El análisis realizado con este programa consta de tres pasos: primero se calculan las frecuencias alélicas, después se realiza una simulación de parentesco y, por último, con los datos obtenidos, el análisis de parentesco.

Además de un análisis de parentesco, con este programa se han efectuado estimas de diversidad genética como: número de alelos, heterozigosidad observada y esperada, contenido de información polimórfica (PIC), equilibrio de Hardy-Weinberg, porcentajes de exclusión y probabilidad de alelos nulos. El programa analiza conjuntamente los datos de reproductores y de la descendencia como si fuera una única población, lo que es equivalente a lo que se observaría en la naturaleza.

Además de este programa, para obtener datos de la constitución genética de las poblaciones se han utilizado la versión web del programa GENEPOP (Rousset, 2008) (<http://genepop.curtin.edu.au/>). Con este programa testamos las desviaciones del equilibrio de H-W y se realizaron diversas estimas de diversidad genética como Fis (Weir y Cockerham, 1984), número esperado y observado de heterocigotos y homocigotos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Amplificación y genotipado

Es importante destacar que aunque Smax 02 es un microsatélite de *Scophthalmus maximus* y el F13 se diseñó en la especie congénérica *Solea solea* ambos ofrecen una resolución apropiada. Para el F13 se consiguieron genotipar todos los individuos, mientras que para Smax 02 se observaron problemas de amplificación recurrentes que no pudieron solucionarse.

3.2. Estimas de la diversidad genética

Utilizando el programa Cervus, se efectuó el cálculo de estimadores como Fis, heterocigosis y homocigosis esperada y observada, frecuencia de alelos nulos, contenido en información polimórfica (PIC).

Para comprobar si la población está en equilibrio HW, con el programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998) se efectuó una χ^2 de bondad de ajuste, comparando las frecuencias observadas de los genotipos con las esperadas, calculadas a partir de las frecuencias alélicas asumiendo equilibrio HW (Tabla 3).

Locus	K	N	Ho	He	PIC	HW	F(Null)
Sol 9A	13	66	0.742	0.760	0.717	NS	+0.0027
Sol 13D	8	66	0.955	0.803	0.767	ND	-0.0955
GATA 38	8	67	0.881	0.705	0.653	**	-0.1362
CA 13	13	66	0.742	0.734	0.688	NS	-0.0193
Smax 02	9	43	0.488	0.520	0.462	NS	+0.0132
F 13	12	65	0.815	0.795	0.763	NS	-0.0265

Tabla 3. Estimaciones de diversidad genética. (A: número de alelos, N: Número de individuos analizados, Ho: Heterozigosidad observada, He: Heterozigosidad esperada, PIC: Contenido de Información polimórfica, HW: Equilibrio Hardy -Weinberg, F (Null): Probabilidad de alelos nulos.

Equilibrio Hardy-Weinberg. El equilibrio de HW postula que los individuos de una población se encuentran en dicho equilibrio cuando se trata de una población que se reproduce al azar, lo suficientemente grande y en la que no influyen procesos de migración o mutación que alteren las frecuencias génicas. El análisis realizado con Cervus nos indica que todos los microsatélites se ajustan al equilibrio de HW excepto el GATA 38. El microsatélite Sol 13D es el único para el que Cervus no realiza el test de HW. Según el programa no se ha podido realizar el análisis debido a que el tamaño de la muestra no es suficiente. Está demostrado que un número reducido de individuos provoca desviaciones en el equilibrio, pero en este caso no estaría siendo esta la causa por la que el programa no pueda realizar dicho análisis, pues el número de individuos genotipados para este microsatélite es similar a los otros. Además, el locus que menos individuos genotipados posee es el Smax 02, y para éste sí realiza análisis.

Heterocigosidad. Los resultados de heterocigosidad observada se ajustan bien a lo esperado. Para los microsatélites Smax 02 y Sol 9A, la heterocigosidad esperada es ligeramente mayor que la observada, al contrario que el resto de los casos, esto está relacionado con la frecuencia de alelos nulos. Estos dos microsatélites son los únicos que presentan alelos nulos, lo cual era esperable al observar el exceso de homocigotos con respecto a lo esperado. En nuestro caso, para todos los microsatélites la frecuencia de alelos nulos es muy baja, con excepción del locus Sol 9A. Esto coincide con los datos obtenidos por Castro *et al.*, 2006 en los que el locus Sol 9A presentaba la mayor tasa de alelos nulos (6%). El locus Smax 02 también presenta una frecuencia de alelos nulos más elevada que los restantes loci analizados. En el caso de Smax 02 puede la frecuencia de alelos nulos puede estar sobreestimada pues es el microsatélite que presenta una menor cantidad de individuos de la descendencia genotipados.

Alelos nulos. Con respecto a los alelos nulos, se considera que son nulos aquellos alelos que no se detectan en el genotipado normal de los individuos. Son una causa común de las desviaciones del equilibrio HW en loci microsatélite (Pemberton *et al.*, 1995). La baja ratio de alelos nulos es muy importante para obtener una herramienta fiable de asignación en acuicultura, ya que para que ésta sea correcta, se deben detectar todos los posibles genotipos de los individuos. La frecuencia de alelos nulos no debe superar el 5%, ya que esto comprometería el análisis de parentesco (Marshall *et al.*, 1998). Cuando hay un alelo nulo en un marcador, individuos que parecen homocigotos son en realidad heterocigotos siendo uno de los alelos un alelo nulo. Esta explicación puede aplicarse también a aquellos casos en los que no se consiguió amplificar algún microsatélite para alguno de los individuos, habiendo amplificado correctamente todos los demás.

Contenido en Información Polimórfica. El valor del PIC (contenido en información polimórfica) (Botstein *et al.*, 1980), es indicativo de la validez y fiabilidad de los marcadores para asignación. Depende del número de alelos y de la distribución de frecuencias. Valores superiores a 0.5 se consideran muy informativos. Nuestros datos son muy similares a los obtenidos por Porta *et al.*, 2004 y Castro *et al.*, 2006, lo que indica que el bajo número de individuos analizado no nos ha impedido observar la mayoría de los alelos de cada locus. Los valores obtenidos son mayores de 0.5, con excepción del locus Smax 02, debido a que es el microsatélite del que menos individuos se han conseguido genotipar. Parece probable que la explicación para este dato en Smax 02 sea que se trata de un microsatélite descrito para rodaballo (*Scophthalmus maximus*), lo que explica no solo su bajo valor de PIC sino la presencia de nulos. Estos valores de PIC obtenidos muestran que los microsatélites empleados en el estudio son un buen conjunto de marcadores.

3.3. Análisis de parentesco

3.3.1. Análisis de parentesco con el programa Vitassign

Utilizando la información obtenida para los 6 microsatélites ensayados, el programa Vitassign (Vandeputte *et al.*, 2006) nos permite realizar una asignación de parentales con 0, de 1 a 2 o de 2 a 3 incongruencias. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos tras el análisis con este programa.

Nº de incongruencias	Asignación con incongruencias	Asignación sin incongruencias	No asignados
1	68%	32%	32%
De 1 a 2	86%	32%	10%
De 2 a 3	94%	32%	0%

Tabla 4. Resultados del análisis de parentesco con Vitassign.

Porcentaje de asignación con 6 microsatélites. Se observa que incrementando el número permitido de incongruencias el porcentaje de individuos asignados es mayor, siendo constante el número de asignaciones perfectas. Hay individuos de los que no se dispone de información para uno o dos microsatélites, normalmente F13 y Smax 02, ambos diseñados en otras especies y con algunos problemas de amplificación. Este hecho es el responsable de la mayoría de las asignaciones con incongruencias. En general, las causas más comunes de error han sido fallos en la lectura de genotipos o ausencia de datos en algunos de ellos.

Además de esta fuente de error, han surgido otros problemas como en el caso del microsatélite Smax 02, ya que su reducido tamaño (80 pb) convirtió las etapas de amplificación y genotipado en un proceso muy complejo.

En las asignaciones que no son perfectas, el programa asigna varios posibles padres para cada hijo. Los genotipos correspondientes se han revisado y asignándose a cada hijo los parentales más probables. Un ejemplo de estas incongruencias debido a la falta de datos de genotipado es el del individuo 17: sus parentales son la pareja formada por el macho 1 y la hembra 8, pero el programa mostraba incongruencias debido a que no se disponía de datos del

genotipado de los microsatélites Sol 9A y Sol 13D para ese descendiente. Posteriormente, se revisaron los genotipos del individuo de la descendencia y se asignaron los parentales correctamente.

Las asignaciones perfectas y las que fueron revisadas muestran que hay una sola pareja de parentales, formada por el macho 1 y la hembra 8, ambos parentales F1.

Porcentaje de asignación con 4 microsatélites. En vista de los resultados obtenidos, decidimos eliminar del análisis los microsatélites responsables de las incongruencias (Smax 02 y F13) y efectuar de nuevo el análisis de parentesco con los 4 restantes (Sol 13D y Sol 9A (Porta *et al.*, 2006) y GATA 38, Sol CA13). En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el análisis de parentesco eliminando Smax 02 y F13.

Nº de incongruencias	Asignación con incongruencias	Asignación sin incongruencias	No asignados
1	82%	42%	14%
De 1 a 2	90%	42%	2%
De 2 a 3	93%	42%	0%

Tabla 5. Resultados del análisis de parentesco con Vitassign de los microsatélites Sol 9A, Sol 13D, GATA 38 y Sol CA 13.

Los datos obtenidos tras el nuevo análisis indican que éste es más robusto que el realizado teniendo en cuenta a los microsatélites Smax 02 y F13. El porcentaje de asignación con una o dos incongruencias aumenta de 86% a 90%, observándose

un notable descenso de los individuos no asignados (del 10% al 2%). También se observa una acusada reducción del número de individuos no asignados en el caso en el que sólo se le permite al programa realizar el análisis con una incongruencia: de 32% a 14%. Las asignaciones perfectas aumentaron de 32% a 42%. Estos datos indican que, eliminando las dos principales fuentes de error en la asignación, el análisis de parentesco es más fiable.

3.3.2. Análisis de parentesco con el programa Cervus

Ligamiento. El análisis con Cervus indica que los loci Sol CA 13, F13, GATA 38, Sol 9A y Smax 02 presentan segregación independiente, es decir, no se encuentran ligados. Si hubiese ligamiento entre alguno la probabilidad de exclusión podría estar sobreestimada (Castro *et al.*, 2006). Este resultado contrasta con el obtenido por Castro *et al.*, 2006 que analizando 4 familias de lenguado senegalés procedentes de *Stolt Sea Farm* observaron una desviación significativa de la asociación al azar entre F13 y Sol9A en todas las familias sugiriendo ligamiento entre ambos marcadores. En cualquier caso, aunque no hemos detectado indicio alguno de ligamiento en nuestros datos, si así fuera, no supondría problema alguno pues a la vista de los resultados obtenidos con el programa Vitassign el microsatélite F13 será eliminado de la herramienta de asignación.

Porcentajes de exclusión con 6 microsatélites. Los porcentajes de exclusión se calculan respecto a los genotipos de la descendencia (Tabla 6). El programa Cervus aporta datos de la probabilidad combinada de exclusión, lo que nos informa acerca de la fiabilidad del análisis, ya que es la probabilidad de que la asignación errónea de un progenitor sea detectada en el análisis de parentesco

(Jamieson, 1994). Excl1 es la probabilidad de exclusión conociendo a uno de los parentales y Excl2 es la probabilidad de exclusión conociendo a los dos. En todos los casos el valor de Excl2 es menor que Excl1 (Tabla 6). La probabilidad de exclusión para todos los microsatélites en conjunto conociendo a un padre es de 0.06923 y conociendo a ambos padres 0.01044, lo que indica que la probabilidad de que la pareja asignada como padres no sea correcta es del 1.04%. Estos valores muestran que la asignación es muy fiable, ya que las probabilidades de que los parentales sean otros que difieren con los asignados, es muy baja.

Son unos buenos valores para el análisis de parentesco. Se observa que el microsatélite que presenta un porcentaje de exclusión más elevado es el Smax 02, ya que es del que menos individuos de la descendencia se han conseguido genotipar, y por ello, se han obtenido menos datos para asignarlos a sus correspondientes parentales, dando lugar en ocasiones a errores en la asignación, que, posteriormente fueron revisados.

Locus	Excl 1	Excl 2
Sol 9A	0.638	0.461
Sol 13D	0.578	0.401
GATA 38	0.713	0.539
Sol CA13	0.663	0.489
Smax 02	0.858	0.716
F 13	0.572	0.395

Tabla 6. Porcentajes de exclusión para cada microsatélite obtenidos con el programa Cervus.

Con el programa Cervus (Marshall *et al.*, 1998) se obtuvo un archivo que contiene a los posibles padres (Figura 6).

Offspring ID	Loci typed	First candida	Loci typed	Pair loci com	Pair loci misi	Pair LOD scoi	Pair top LOD	Pair confider	Second cand	Loci typed	Pair loci com	Pair loci mismatching	Pair LOD score	Pair top LOD	Pair cor
Ind1H	6 Ind1	6	6	6	6	0	1,82E+00	1,82E+00 *	Ind8	6	6	6	1	-3,40E+00	-3,40E+00 +
Ind2H	6 Ind1	6	6	6	6	0	2,25E+00	2,25E+00 *	Ind5	5	5	5	0	2,28E-01	2,28E-01 +
Ind3H	6 Ind1	6	6	6	6	0	-1,35E-01	-1,35E-01 +	Ind8	6	6	6	1	-3,37E+00	-3,37E+00 +
Ind4H	5 Ind1	6	5	6	5	1	-2,86E+00	-2,86E+00 +	Ind8	6	5	6	1	-3,78E+00	0,00E+00
Ind5H	6 Ind1	6	6	6	6	1	-3,74E+00	-3,74E+00 +	Ind2	6	6	6	2	-7,30E+00	0,00E+00
Ind5H	6 Ind1	6	6	6	6	1	-3,74E+00	-3,74E+00 +	Ind8	6	6	6	2	-7,30E+00	0,00E+00
Ind6H	6 Ind1	6	6	6	6	0	1,20E+00	1,20E+00 +	Ind8	6	6	6	0	-4,51E-01	-4,51E-01 +
Ind7H	6 Ind1	6	6	6	6	0	-2,68E-01	-2,68E-01 +	Ind8	6	6	6	1	-3,45E+00	-3,45E+00 +
Ind8H	6 Ind1	6	6	6	6	0	1,26E+00	1,26E+00 +	Ind8	6	6	6	2	-8,27E+00	-8,27E+00 +
Ind9H	6 Ind1	6	6	6	6	1	-4,39E+00	-4,39E+00 +	Ind5	5	5	5	1	-3,73E+00	-3,73E+00 +
Ind10H	6 Ind1	6	6	6	6	0	9,45E-01	9,45E-01 +	Ind8	6	6	6	0	-8,05E-01	-8,05E-01 +
Ind11H	6 Ind1	6	6	6	6	0	1,40E+00	1,40E+00 +	Ind8	6	6	6	0	-1,06E-01	-1,06E-01 +
Ind12H	5 Ind1	6	5	6	5	0	1,18E+00	1,18E+00 +	Ind8	6	5	6	0	9,05E-02	9,05E-02 +
Ind13H	6 Ind1	6	6	6	6	0	8,69E-01	8,69E-01 +	Ind5	5	5	5	1	-4,06E+00	-4,06E+00 +
Ind14H	6 Ind1	6	6	6	6	0	5,25E-01	5,25E-01 +	Ind2	6	6	6	1	-3,94E+00	-3,94E+00 +
Ind14H	6 Ind1	6	6	6	6	0	5,25E-01	5,25E-01 +	Ind8	6	6	6	1	-3,94E+00	0,00E+00
Ind15H	6 Ind1	6	6	6	6	0	4,66E-01	0,00E+00	Ind8	6	6	6	0	8,35E-01	8,35E-01 +
Ind16H	6 Ind1	6	6	6	6	0	8,71E-01	8,71E-01 +	Ind13	6	6	6	3	-1,13E+01	-1,13E+01 +
Ind17H	3 Ind5	5	2	1	3	1	-3,79E+00	0,00E+00	Ind8	6	3	6	1	-2,81E+00	-2,81E+00 +
Ind18H	5 Ind1	6	5	6	5	0	6,69E-01	6,69E-01 +	Ind5	5	4	5	1	-4,09E+00	0,00E+00
Ind19H	6 Ind1	6	6	6	6	0	3,26E-02	3,26E-02 +	Ind8	6	6	6	0	1,32E-01	1,32E-01 +
Ind20H	6 Ind4	6	6	6	6	2	-5,86E+00	0,00E+00	Ind8	6	6	6	1	-2,43E+00	-2,43E+00 +

Figura 6. Salida del programa Cervus, las asignaciones perfectas en azul y las que deben ser revisadas en amarillo.

A pesar de que hay algunas incongruencias en algunos alelos, la asignación muestra una única pareja de parentales que corresponden al macho 1 y a la hembra 8 (ambos pertenecientes a la generación F1), en el 66% de los casos. En el 34% restante de los individuos se comprobaron los genotipos y la pareja que mejor se asocia a éstos son la hembra 8 y el macho 1.

Hay diferentes errores que se pueden cometer cuando se trabaja con microsatélites: ausencia de amplificación, artefactos en ésta, así como errores humanos en la lectura de los genotipos (Bonin *et al.*, 2004; Hoffman y Amos, 2005). Los errores de genotipado son mayores en heterocigotos para alelos adyacentes y éstos son una de las principales causas de falsa exclusión, llegando incluso al 23% (Hoffman y Amos, 2005). Esta problemas pueden comprometer o interferir en el análisis de parentesco (Marshall *et al.*, 1998; Glaubitz *et al.*, 2001), especialmente cuando los padres candidatos son excluidos basándose en una sola incongruencia (Hoffman y Amos, 2005).

Los errores en asignación de parentesco cuando se trabaja con microsatélites suelen ser del 2% (Castro *et al.*, 2004; Bonin *et al.*, 2004; Hoffman y Amos, 2005), debido a errores de genotipado o a la presencia de alelos nulos. En nuestro caso, el error es 1,04% lo cual significa que el conjunto de marcadores seleccionados es perfecto para identificar a los parentales. Además, los individuos que no se consiguieron asignar de forma correcta inicialmente, una vez revisados, mostraron como única pareja de parentales la formada por la hembra 1 y el macho 8, ambos pertenecientes a la generación F1.

Porcentajes de exclusión con 6 microsatélites. Una vez eliminados los microsatélites F13 y Smax02 del análisis, el porcentaje de asignaciones incorrectas desciende de un 34% a un 18%. Este resultado confirma que ambos eran los causantes de la mayoría de las incongruencias que interferían en el análisis, cómo ya habíamos observado en el análisis con Vitassign (Tabla 6).

Offspring ID	Loci typed	First candid Loci typed	Pair loci con	Pair loci mis	Pair LOD sco	Second cand Loci typed	Pair loci con	Pair loci mis	Pair LOD sco	Trio loci con	Trio loci mis	Trio LOD sco	Trio Delta	Trio confidence	
Ind1H	4	Ind1	4	4	0	1,06E+00	Ind8	4	4	1	-3,43E+00	4	1	-1,13E+00	0,00E+00
Ind2H	4	Ind1	4	4	0	1,87E+00	Ind8	4	4	0	-4,49E-01	4	0	2,97E+00	5,33E-03 -
Ind3H	4	Ind1	4	4	0	-2,17E-01	Ind8	4	4	1	-3,77E+00	4	1	-1,72E+00	0,00E+00
Ind4H	4	Ind1	4	4	0	1,06E+00	Ind8	4	4	0	1,69E-01	4	0	2,54E+00	2,54E+00 +
Ind5H	4	Ind1	4	4	0	4,35E-01	Ind2	4	4	1	-3,71E+00	4	1	-2,67E+00	0,00E+00
Ind5H	4	Ind1	4	4	0	4,35E-01	Ind8	4	4	1	-3,71E+00	4	1	-2,67E+00	0,00E+00
Ind6H	4	Ind1	4	4	0	1,11E+00	Ind8	4	4	0	1,69E-01	4	0	2,59E+00	2,59E+00 +
Ind7H	4	Ind1	4	4	0	3,29E-01	Ind8	4	4	1	-3,18E+00	4	1	-1,46E+00	0,00E+00
Ind8H	4	Ind1	4	4	0	6,55E-01	Ind8	4	4	1	-4,05E+00	4	1	-1,56E+00	0,00E+00
Ind9H	4	Ind1	4	4	0	-2,17E-01	Ind8	4	4	1	-3,71E+00	4	1	-1,66E+00	0,00E+00
Ind10H	4	Ind1	4	4	0	-1,15E-01	Ind8	4	4	0	-1,74E-01	4	1	-1,33E+00	0,00E+00
Ind11H	4	Ind1	4	4	0	8,01E-01	Ind8	4	4	0	-1,12E-01	4	1	-3,49E-01	0,00E+00
Ind12H	4	Ind1	4	4	0	9,98E-01	Ind8	4	4	0	-1,74E-01	4	0	2,81E+00	2,81E+00 +
Ind13H	4	Ind1	4	4	0	9,45E-01	Ind8	4	4	0	-1,12E-01	4	0	2,82E+00	3,49E-03 -
Ind14H	4	Ind1	4	4	0	1,12E+00	Ind2	4	4	1	-3,71E+00	4	1	-2,21E+00	0,00E+00
Ind14H	4	Ind1	4	4	0	1,12E+00	Ind8	4	4	1	-3,71E+00	4	1	-2,21E+00	0,00E+00
Ind15H	4	Ind1	4	4	0	3,82E-01	Ind8	4	4	0	4,15E-01	4	0	2,26E+00	3,49E-03 -
Ind16H	4	Ind1	4	4	0	2,67E-01	Ind2	4	4	2	-7,77E+00	4	2	-6,09E+00	0,00E+00

Tabla 6. Salida del programa Cervus, excluyendo los microsatélites Smax 02 y F13. Las asignaciones perfectas en azul y las que deben ser revisadas en amarillo.

3.4. Diseño de la herramienta de asignación

Como ya se indicó con anterioridad las herramientas disponibles hasta el momento (Castro *et al.*, 2206; Porta *et al.*, 2006) no resultaron adecuadas en nuestro caso de estudio pues no se obtuvo un porcentaje de asignación adecuado. Los resultados obtenidos en los diferentes análisis de parentesco muestran que, el mejor conjunto de microsatélites para crear una herramienta de análisis fiable es el formado por los marcadores Sol 13D, Sol 9 A, GATA 38 y Sol CA13.

En el caso de la herramienta propuesta por Castro *et al.*, 2006 formada por los marcadores Sol CA13, F13, Smax 02 y GATA 38, resulta sorprendente la elevada probabilidad de asignación que observan pues, dos de los microsatélites presentes en su herramienta (Smax 02 y F13) han sido finalmente descartados por nosotros por ser los responsables de la mayoría de las incompatibilidades y o incongruencias en dicho análisis.

La herramienta de asignación propuesta por Porta *et al.* (2006) está formada por 5 marcadores a saber, Sol 19A, Sol 13D, Sol 9A, Sol MII y Sol CA13, en las pruebas efectuadas con puestas reales, la asignación fue del 100%. Además, para validar la idoneidad y fiabilidad de la herramienta los autores efectúan una serie de simulaciones y predicciones teóricas con las que obtienen unos valores entre 98% y 90% de asignación. Sin embargo, a pesar de que los autores describen las condiciones para efectuar la amplificación en multiplex, no conseguimos repetir sus resultados en el laboratorio y decidimos testar cada microsatélite por separado.

Con nuestra herramienta asignamos los individuos a los parentales con más de un 98% de fiabilidad y utilizamos un marcador microsatélite menos que Porta *et al.* (2006) lo que abarata los costes de asignación.

3.5. Entonces, ¿Quiénes son los padres?

Una vez aplicada la herramienta y según los datos de que disponemos con respecto a los parentales, los análisis efectuados con los dos programas de asignación disponibles nos indican que ambos parentales pertenecen a la generación F1.

La trazabilidad de los individuos es muy importante en este tipo de trabajos pues cualquier error en la identificación de los mismos podría dar como resultado una asignación errónea. Las consecuencias de una mala asignación pueden ser desastrosas si esa información se utiliza para la fundación de nuevos stocks.

En nuestro caso, todos los individuos parentales están marcados con un chip con un código numérico. Este chip se implantó en los individuos previamente a la utilización de los mismos en la fundación de los dos tanques que constituyen el experimento. Asociados a ese código se mantienen actualizados los datos de origen, sexo y otras características biológicas. En el momento de la toma de muestras, se extrae un trozo de aleta caudal que se conserva en alcohol y se guarda con el mismo código del chip del individuo para permitir la trazabilidad.

Por tanto, atendiendo a la información de los códigos de los reproductores, los datos genéticos obtenidos en el presente trabajo nos indican que ambos parentales pertenecen a la generación F1. Siendo este el primer caso en el que de manera espontánea se obtiene una puesta F2 en cautividad.

CONCLUSIONES

- ✓ La selección de marcadores es de vital importancia para que la asignación sea correcta y fiable.
- ✓ Con nuestra herramienta reducimos el número de marcadores con respecto a Porta *et al.* (2006) y obtuvimos una herramienta fiable y más económica.
- ✓ La eliminación de marcadores obtenidos para otras especies disminuye la probabilidad de error y aumenta la probabilidad de asignación.
- ✓ Se ha podido demostrar que por primera vez se han obtenido larvas F2 de *Solea senegalensis*, como resultado de la mezcla en el mismo tanque de individuos salvajes e individuos pertenecientes a la generación F1.
- ✓ Estos nuevos datos acerca del lenguado senegalés pueden ayudar en la optimización de su cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agulleiro, M. J. 2008. Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): Mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura. Tesis doctoral, Universitat de Valencia.
- Anguis, M. V., Cañavate J. P. 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Balloux, F., Goudet, J. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Mol. Ecol.* 11: 771-783.
- Bijma, P., Van Arendonk, J. A. M., Woolliams, J. A. 2001. Predicting rates of inbreeding for livestock schemes. *J. Anim. Sci.* 79: 840- 853.
- Bonin, A., Bellemain, E., Bronken Eidesen, P., Pompanon, F., Brochmann, C., Taberlet, P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13, 3261–3273.
- Botstein, D., White, R.L., Skolmick, H., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Human Gen.*, 32, 314-331.
- Burrow, H.M. 1993. The effects of inbreeding in beef cattle. *Anim. Breed. Abstr.* 65: 477-495.
- Cañavate, J. P. 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 147-154.
- Carazo, I., Chereguini, O., Huntingford, F., Martin, I., Norambuena, F., Duncan, N. 2009. Observaciones del cortejo de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) salvaje mantenido en cautividad. En: XII Congreso Nacional de Acuicultura. Madrid, 24 - 26 Noviembre, 2009
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Riaza, A., Ferreiro, I., Sánchez, L., Martínez, P. 2004. Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* 242, 119–135.

- Castro, J., A. Pino, M., Hermida, C., Bouza, A. Ríaza, I., Ferreiro, L., Sánchez, P., Martínez. 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions. *Aquaculture* 261: 1194–1203.
- Crow, J. F., Kimura M. 1970. An introduction to population genetics theory. New York, Evanston and London. Harper and Row Publishers. pp. 83-98.
- Cruz, F., Pérez M., Presa, P. 2005. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of *Bivalvia*. *Gene* 346: 241- 247.
- Dinis, M.T. 1986. Quatre Soleidae de l'Estuarie du tague. Reproduction et Croissance. Essai d'Elevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'État ès -Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, Brest, Francia.
- Dinis, M.T. 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to artificial diets. *Aquacult. Fish. Manag.* 23: 515-520.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176: 27–38.
- Drake, P., Arias A. M., Rodríguez A. 1984. Cultivo extensivo de peces marinos en los esteros de las salinas de San Fernando (Cádiz): II. Características de la producción de peces. *Inf. Tec. Inst. Invest. Pesq.* 116: 1-23.
- Ellegren, H. 1993. Polymerase chain reaction (PCR) analysis of microsatellites: A new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk* 109: 886-895.
- Estoup, A., Presa, P., Krieg, F., Vaiman, D., Guyomard, R. 1993. (ct) n and (gt) n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity* 71: 488- 496.
- Falcao, S., Filho, M.R., Magnabosco U. C., Bozzi, R., Lima, M. F. A. 2001. Efeitos da endogamia sobre características de reprodução, crescimento e valores genéticos aditivos de bovinos de raça Pardo-Suíça. *Rev. Bras. Zootec.* 30: 83-92.
- Fitzsimmons, N. N., Moritz, C., Moore, S. S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* 12: 432-440.

- Glaubitz, J.C., Emebiri L.C., Moran, G.F. 2001. Dinucleotide microsatellites from *Eucalyptus sieberi*: inheritance, diversity, and improved scoring of single-base differences. *Genome* 44: 1041–1045.
- Goldstein, D. B., Ruiz, A., Cavalli-Sforza, L. L., Feldman, M. W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139: 463-471.
- González-Candelas, F., Montolio A. 2000. Genetic differentiation and structure of *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) populations. *J. Hered.* 91: 134-141.
- González, E. G. (2003) Microsatélites: Sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3): 377-388.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D. B and Schlöterer, C. (eds.). *Microsatellites. Evolution and applications*. Oxford University Press. New York: 1-9.
- Hauser L., Adcock, G. J., Smith, P. J., Bernal-Ramírez J. H., Carvalho G. R. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 11742–11747.
- Hoffman, J.I., Amos, W. 2005. Does kin selection influence fostering behaviour in Antarctic fur seals (*Arctocephalus gazella*) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* 272: 2017–2022.
- Hoss, M., Paabo, S. 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucl. Acids Res.* 21: 3913-3914.
- Jamieson, A. 1994. The effectiveness of using codominant polymorphic allelic series for 1 checking pedigrees and 2 distinguishing full-sib pair members. *An. Genet.* 25(Suppl. 1): 37-44.
- Kimura, M., Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- Kimura, M., Ohta, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *PNAS* 75: 2868-2872.
- Koskinen, M. T., Nilsson, J., Veselov, A. J. E., Poututkin, A. G., Ranta, E., Primmer, C. R. 2002. Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391-401.

- Li, Y.-C., Abraham, B. K., Fahima, T., Avigdor, B., Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11: 2453-2465.
- Litt, M., Luty J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Amer. J. Human Genet.* 44: 397-401.
- Mañanos, E. 2011. Hormonal control of reproduction in senegalensis sole. In 5 th Workshop on the Cultivation of Soles CCMAR, University of the Algarve, Faro, Portugal. 5-7 April, pp.12.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- McParland, S., Kearney, J.F., Rath, M., Berry, D.P. 2007. Inbreeding trends and pedigree analysis of Irish dairy and beef cattle populations. *J. Anim. Sci.* 85: 322-331.
- Molina, A., Rodero, A., Valera, M. 1995. Análisis genético de los niveles de consanguinidad en la raza Retinta. *Arch. Zootec.* 44: 257-265.
- Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M. & Hoetzel, D. J. S., 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.
- Morgante, M., Olivieri AM. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-82.
- Pardo, B.G., Hermida, M., Fernández, C., Bouza, C., Pérez, M., Llavona, A., Sánchez, L., Martínez, P., 2006. A set of highly polymorphic microsatellites useful for kinship and population analysis in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquac. Res.* 37: 1578–1582.
- Paterson, B.M., Walldorf, U., Eldridge, J., Dubendorfer, A., Frasch, M., Gehring, W.J. 1991. The *Drosophila* homologue of vertebrate myogenic-determination genes encodes a transiently expressed nuclear protein marking primary myogenic cells. *PNAS* 88: 3782-3786.

- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., Barrett, J. A. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4(2): 249–252.
- Pérez, M., Cruz, F., Presa, P. 2005. Distribution Properties of Polymononucleotide Repeats in Molluscan Genomes. *J. Hered.* 96: 40–52.
- Pérez, M., Presa, P. 2011. FENOSALT: un método sintético para la extracción de ADN de peces y moluscos. P 79-87. En: García-Estévez, J. M., Olabarria, C., Pérez, S., Rolán-Álvarez, E., Rosón, G. (Eds). *Métodos y Técnicas en investigación marina*. Editorial Tecnos, Madrid. 404p.
- Pita, A., Presa, P., Pérez, M. 2010. Gene flow, multilocus assignment and genetic structuring of the European hake (*Merluccius merluccius*). *Thalassas* 26: 129–133.
- Pita, A., Pérez, M., Cerviño, S., Presa, P. 2011. What can gene flow and recruitment dynamics tell us about connectivity between European hake stocks in the Eastern North Atlantic? *Cont. Shelf Res.* 31: 376–387
- Porta, J., Alvarez, C. 2004. Development and characterization of microsatellites from Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Mol. Ecol. Notes* 4: 277 –279.
- Porta, J., Porta, J. M., Martínez-Rodríguez, G., Álvarez, M. C. 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251: 46–55.
- Primmer, C. R., Merila, J. 2002. A low rate of cross-species microsatellite amplification success in ranid frogs. *Conserv. Genet.* 3: 445–449.
- Primmer, C. R., Ellegren, H. 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 15: 997–1008.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., Chereguini, O. 2012. Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture* 326–329: 129–135.
- Rodríguez, A., Pascual, E. 1982. Primeros ensayos sobre utilización de la hipófisis del atún (*Thunnus thynnus*) en la maduración y puesta de *Solea senegalensis* y *Sparus aurata*. *Inv. Pesq.* 97: 1–11.

- Rodríguez, R. B. 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. Tesis, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Rousset, F. 2008. Genepop07: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8: 103–106.
- Ruíz-Flores, A., Núñez-Domínguez, R., Ramírez- Valverde, R., Domínguez-Viveros, J., Mendoza- Domínguez, M., Martínez-Cuevas, E. 2006. Niveles y efectos de la consanguinidad en variables de crecimiento y reproductivas en bovinos Tropicarne y Suizo. *Agrociencia* 40: 289-301.
- Sibly, R. M., Meade, A., Boxal, N., Wilkinson, M., Corne, D. W., Whittaker, J. C., 2003. The structure of interrupted human AC microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 20: 453-459.
- Sloane, M. A., Sunnucks, P., Alpers, D. L., Behegaray, L. B., Taylor, A. C., 2000. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censusing method. *Mol. Ecol.* 9: 1233-1240.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucl. Acids Res.* 12: 4127-4138.
- Vandeputte, M., Mauger, S., Dupont-Nivet, M. 2006. An evaluation of allowing for mismatches as a way to manage genotyping errors in parentage assignment by exclusion. *Mol. Ecol. Notes* 6: 265-267.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A., Higuchi, R. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing forensic material. *Biotechniques* 10: 506-13.
- Wang, J. 2012. Computationally Efficient Sibship and Parentage Assignment from Multilocus Marker Data. *Genetics* 191: 183-194.
- Weber, J. L., May, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Amer. J. Human Gen.* 44: 388-396
- Weir, B.S., Cockerham C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.
- Zardoya, R., Vollmer, D. M., Craddock, C., Streelman, J. T., Karl, S., Meyer, A. 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their

use in resolving phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). Proc. Royal Soc. London B 263: 1589-1598.